Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen

(Direktor: Prof. Dr. N. HENNING)

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER

DIE FRAGE DER GEZIELTEN ORGANALLERGIE

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich - Alexander - Universität

zu

Erlangen

vorgelegt von

Friedrich Eberlein

aus Nürnberg

1958 №86

Dekan: Professor Dr. F. H e i m

Referent: Professor Dr. N. H e n n i n g

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Okt. 1958

Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin, Bd. 129, S. 465—470 (1958)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. Henning)

Zur Frage der gezielten Organallergie

(Experimentelle Untersuchungen der organspezifischen Antigenität von Leberphosphatid)

Von

F. Scheiffarth, M. Gemählich und F. Eberlein

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. April 1957)

Erfahrungsgemäß ist ein lokalisatorischer Effekt bei experimentellen allergischen Organveränderungen nur durch mechanische, thermische, chemische oder biologische (z. B. hormonale) Gewebsvorschädigungen zu erreichen[7, 16, 2]. Die Entdeckung der Cytotoxinwirkung im Sinne des Masugi-Prinzipes war in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Bislang hat sich dieser Effekt an anderen Organen nicht sicher reproduzieren lassen. Allerdings hat Joanovicz bereits 1909 — also noch vor Masugi — Versuche mit einem hepatotoxischen Kaninchenserum durchgeführt, das Schockreaktionen und später chronisch degenerative und cirrhotische Leberveränderungen hervorrief[5]. Diese später in gewisser Weise bestätigten Beobachtungen[13, 12] wie auch das von Cavelti beschriebene Prinzip der allergischen Leberschädigung durch arthomologes Lebereiweiß mit Streptokokken[1, 14] geben jedoch morphologisch keinen beweisenden Aufschluß über die allergische Ursache der Parenchymschädigung.

Die Darstellung eines für jedes Organ verwendbaren „Antigengemisches" mit spezifischer Organantigenität schien Maekawa gelungen, der mit seinen Untersuchungsergebnissen ein neuartiges pathogenetisches Prinzip der Organallergie beschrieb[9, 10, 11]. Demnach zeigt das durch bestimmte Extraktionsverfahren gewonnene Gewebsphosphatid als Hapten bei Koppelung an eine proteine Schleppersubstanz eine gezielte Organspezifität. Eine Speciesspezifität kommt ihm nicht zu, ohne Bindung an Proteine soll es desensibilisierend wirken.

Die erfolgreiche Anwendung dieses Prinzipes wurde von Maekawa für eine Reihe von Kaninchengeweben (Herz, Niere, Magen, Pleura, Peritoneum, Erythrocyten, Leukocyten, Lymphocyten) beschrieben und von Terai[15] für das Gehirngewebe bestätigt.

Um die Verwendbarkeit dieses Extraktes zur Darstellung einer gezielten hyperergischen Reaktion an der Leber zu prüfen, war es Ziel unserer Untersuchungen, unter Verwendung eines species- wie organspezifischen Leberphosphatidextraktes, komplettiert durch Rinderserum als Schlepper, festzustellen, ob und inwieweit dabei morphologische Veränderungen der Rattenleber intravital wie histologisch faßbar werden.

Material und Methodik

A. Materialgewinnung

Der Extrakt wurde aus den Lebern von 15 gesunden Albinoratten eines Stammes gewonnen. Bei der Darstellung der Cephalinfraktion hielten wir uns hauptsächlich an die Angaben von Maekawa; aus dieser Fraktion wurde entsprechend der Methode von Folch[3] das Phosphatid — genauer die Inositol-Phosphatid-Fraktion — isoliert.

Die Rattenbauchhöhle wurde im Ätherrausch durch medianen Längsschnitt eröffnet und die Versuchstiere durch Anschneiden der Vena cava inferior entblutet. Bei noch schlagendem Herzen wurde die Leber entnommen, kurz in physiologischer Kochsalzlösung gespült, gewogen (das Gesamtgewicht betrug 107,6 g) und mit Alkoholäther in einem Mörser zerrieben. Diese Mischung blieb über Nacht im Kühlschrank und wurde am folgenden Tag 20 min lang in der Schüttelmaschine homogenisiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und das Sediment noch 3mal mit Alkoholäther ausgewaschen. Destillation bei 55° C und mäßigem Unterdruck entfernte den Alkoholäther des Extraktes. Der dunkelgrüngraue, sirupartige Rückstand blieb 12 Std in Benzol stehen, die nicht benzollöslichen Anteile wurden 3mal mit Benzol ausgewaschen. Der benzollösliche Extrakt hatte eine gelblich-grüne Farbe; nach Abdestillation des Benzols erhielten wir einen grünbraunen Rückstand. Dieser wurde mehrmals mit Aceton ausgewaschen und der acetonlösliche Anteil abpipettiert. Der acetonunlösliche Rückstand bildete nach Trocknung im Exsiccator einen gelbbraunen Belag auf dem Boden des Kolbens. Er ging in Petroläther fast völlig in Lösung; die wenigen unlöslichen Partikel wurden 3mal mit Petroläther ausgewaschen. Nach Abdestillation des Petroläthers wurde der Rückstand im Exsiccator getrocknet, er zeigte eine tief dunkelbraune Farbe. In Alkohol, der unter ständigem Schütteln auf 70° C erwärmt wurde, trat fast vollständige Lösung ein. Aus dem abpipettierten warmen Alkohol fiel nach Abkühlen die in kaltem Alkohol unlösliche Substanz als brauner Niederschlag aus, der sich fast vollständig in Äther löste. Nach Verdampfen des Äthers und Trocknung im Exsiccator fand sich die Cephalinfraktion als gelbbrauner, feinrissiger Belag auf dem Boden des Kolbens.

Aus dem Gesamtmaterial der 15 Rattenlebern von 107,6 g wurden auf diese Weise 480 mg Lebercephalin gewonnen. Die Auftrennung des Cephalin in seine Untergruppen und die Darstellung der Fraktion I (Inositolphosphatid) wurden nach der von Folch für Gehirngewebe angegebenen Methode[3] vorgenommen. Die Gesamtausbeute an Inositolphosphatid betrug 91,1 mg.

B. Versuchsanordnung

Zur Untersuchung wurden 21 gesunde Albinoratten (200—250 g schwer) des gleichen Stammes in 4 Gruppen unterteilt und folgendermaßen behandelt:

Gruppe I (10 Ratten): Sensibilisierung wie Reinjektion wurden allein mit der Schleppersubstanz, also mit Rinderserum vorgenommen.

Gruppe II (3 Ratten): Die Sensibilisierung wurde allein mit Rinderserum, die Reinjektion mit Rinderserum und Phosphatid zusammen ausgeführt.

Gruppe III (3 Ratten): Sowohl bei der Sensibilisierung als auch zur Reinjektion erhielten die Tiere Rinderserum und Phosphatid zusammen.

Gruppe IV (5 Ratten) diente zur Kontrolle und wurde mit zeitlich wie mengenmäßig entsprechenden Injektionen von physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

Die *Sensibilisierung* wurde an 4 aufeinanderfolgenden Tagen vorgenommen. Dabei erhielten die Ratten der Gruppen I und II täglich jeweils 0,5 cm^3 Rinderserum, die der Gruppe III jeweils 5 mg Phosphatid in 0,5 cm^3 Rinderserum und die der Gruppe IV 0,5 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung als subcutane Injektion.

Die *Reinjektion* wurde 20 Tage später durchgeführt. Von der Gruppe I wurden 3 Tiere einen Tag, 3 Tiere 2 Tage und 4 Tiere 3 Tage jeweils mit der Sensibilisierungsdosis als intravenöse Injektion behandelt. In den Gruppen II und III wurde jeweils 1 Tier an 1, 2 und 3 Tagen der Reinjektion unterworfen, wobei in beiden Gruppen Rinderserum und Phosphatid zusammen intravenös gegeben wurde. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten zur Reinjektion ebenfalls die gleiche Dosis physiologischer Kochsalzlösung wie bei der Sensibilisierung. Die Versuchstiere wurden bei allgemeiner gemischter Kost gehalten und ließen während der Versuchszeit keine Zeichen irgendwelcher Störungen erkennen.

C. Untersuchungsmethoden

Es ist mehrfach darauf hingewiesen worden, daß exakte Beweise für ein spezifisches histologisches Substrat als Ausdruck einer hyperergischen Reaktion der sensibilisierten Leber nach Antigenkontakt fehlen[6]. Die Frage, ob dies durch eine etwaige kurze Verweildauer und somit geringere Kontaktzeit des Antigen in der gut vascularisierten Leber oder durch die relative Mesenchymarmut dieses Organes bedingt ist, soll hier nicht besprochen werden[8]. Um möglicherweise auftretende, reversible funktionelle Veränderungen der Leber zu erfassen, wurden die Versuchstiere in vivo während der Reinjektion auflichtmikroskopischen Untersuchungen unterzogen. Die Ratten wurden in Urethannarkose auf einem eigens konstruierten, beheizten Operationstisch operiert; nach intravitaler Totalfluorochromierung mit Acridinorange ließen sich Beobachtungen mit unserem Auflichtmikroskop (Leitzscher Ultropak, UV-Licht, Leitzsche Bogenlampe) gut über einen Zeitraum von bis zu 12 Std ausführen. Danach wurden die Tiere durch Anschneiden der Hohlvene entblutet oder durch intrathorakale Alkoholinjektion getötet, wobei keine Gefäßlumenveränderungen durch agonalen Blutdruckabfall eintreten. Nach makroskopischer Kontrolle wurden die Organe in 10%iger Formalinlösung fixiert. Zur histologischen Untersuchung gelangten Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Knochenmark. An Paraffin- bzw. Gefrierschnitten wurden folgende Färbungen verwendet: Hämatoxylin-Eosin, Sudan-Färbung, Berliner-Blau-Reaktion, van-Gieson-Färbung und die Plasma-Zell-Färbung nach Pappenheim-Unna.

Ergebnisse

Die *intravitale, auflichtmikroskopische* Untersuchung der Rattenleber und -milz zeigte bei allen Tieren normale Struktur; exsudative Veränderungen oder Zellinfiltrationen waren nicht nachweisbar. Bei der Beobachtung mit stärkerer Vergrößerung (bis 550fach) ließen sich keine Zell- oder Kernbesonderheiten erkennen.

Auffällig war jedoch bei den Gruppen I—III folgendes Phänomen: Wenige Sekunden nach der Reinjektion trat eine deutliche *Erweiterung der Lebersinosoide und -capillaren* auf, die bis zu 10 min lang anhielt

(Abb. 2). Diese Capillarerweiterung führte zwar zu einer deutlichen Strömungsverlangsamung des Blutes, Permeabilitätsveränderungen ließen sich jedoch nicht erkennen. In der Gruppe IV war dieses Phänomen nach Injektion auch größerer Mengen physiologischer Kochsalzlösung in keinem Falle zu beobachten.

Bei der *histologischen* Untersuchung der Organe ergab sich folgendes Bild: In keiner Gruppe waren an Herz und Lunge pathologische Veränderungen festzustellen, auch das Knochenmark bot keinen Anhalt

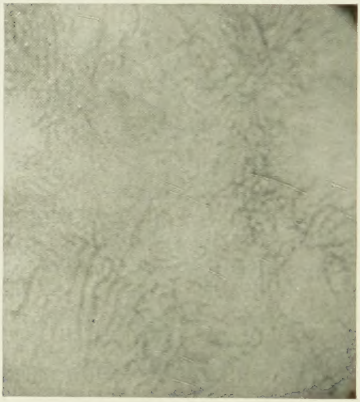

Abb. 1

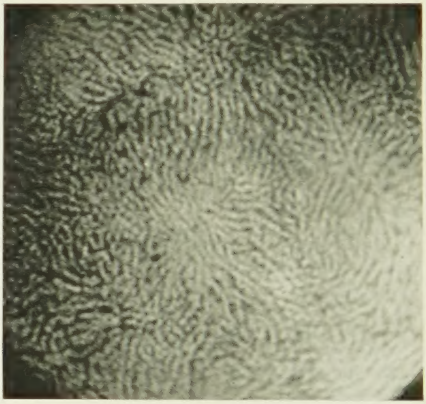

Abb. 2

Abb. 1. Intravitale Mikroaufnahme der Rattenleber (Gruppe I). Helle Fluorescenz der Leberepithelien, Capillaren eng. (Leitzscher Ultropak, Vergrößerung 88 mal, Leitzsche Bogenlampe, UV_t = BG_{12}, UV_a = OG_1, Agfa-Rö-Fluorapidfilm, Belichtungszeit 1 sec, Totalfluorochromierung der Ratte mit Acridin-Orange, 1 cm³ 1:1000, intravenös)

Abb. 2. Intravitale Mikroaufnahme der Rattenleber (Gruppe I) 3 min nach Reinjektion des Fremdserums. Deutliche Erweiterung der Sinusoide und Capillaren. (Technische Daten wie Abb. 1)

für Störungen der Erythro- oder Myelopoese. Dagegen wurde ein pathologischer Befund an folgenden Organen erhoben:

Gruppe I. *Leber:* Deutliche bis ausgeprägte, vorwiegend acinoperiphere großtropfige Verfettung; gelegentlich Einzel- und Gruppenzellnekrosen; geringgradige Hämosiderinspeicherung der Kupfferschen Sternzellen, die im übrigen weder vermehrt noch sonst verändert sind. *Milz:* Deutliche Hämosiderinablagerungen in der Pulpa. *Niere:* Mäßig viel feine bis mittelgroße Fettropfen im Cytoplasma der Tubuluszellen.

Gruppe II. *Leber:* Mäßig starke bis ausgeprägte mittel- und grobtropfige Verfettung, Einzelzellnekrosen. *Milz:* Deutliche Hämosiderose. *Niere:* Mäßig viel feintropfige Fetteinlagerungen in den Tubuluszellen.

Gruppe III. *Leber:* Mäßig stark ausgeprägte acinoperiphere Verfettung, geringe Hämosiderinablagerung in den Kupfferschen Sternzellen. *Milz:* Deutliche Hämosiderose. *Niere:* Mäßig viel feinkörnige Fettropfen in den Tubuluszellen.

Gruppe IV. In keinem der untersuchten Organe war ein krankhafter Befund zu erheben.

Diskussion

Die Befunde lassen erkennen, daß die aus Rattenlebern gewonnene Phosphatidfraktion keine organspezifische Antigenität besitzt. Zwar ließ sich intravital durch Auflichtuntersuchungen unmittelbar nach der Reinjektion ein Vorgang flüchtiger Capillarerweiterung an der Leber der sensibilisierten Ratten erkennen, jedoch konnten typische Veränderungen im Sinne einer Reaktion des Antigens mit den Endothelien der Capillaren und den sich daraus ergebenden Kreislaufschäden an der Endstrombahn nicht festgestellt werden. Diese Capillarerweiterung ist vielmehr im Sinne einer unspezifischen reaktiven Hyperämie zu interpretieren, wie sie nach der Zuführung eines adäquaten Agens in allen Bereichen der experimentellen Pathologie häufig beobachtet wird; allenfalls könnte sie als Ersteffekt einer durch die Reinjektion des Fremdserums eingeleiteten Antigen-Antikörperreaktion ohne besondere Organlokalisation gedeutet werden.

Die an den Lebern histologisch nachweisbare vorwiegend grobtropfige, acinoperiphere Verfettung entspricht dem exogen toxischen Typ, wie er etwa auch nach Phosphor, Arsen oder Chloroform auftritt. Im gleichen Sinne sind die Einzel- und Gruppenzellnekrosen zu deuten, d. h. als unmittelbare Schädigung des Cytoplasma der Leberepithelien. Diffuse oder abgegrenzte Zellinfiltrationen oder weitere Reaktionen des Gefäßbindegewebes waren nicht nachweisbar. Das in den Tubuluszellen der Niere feintropfig verteilte Fett spricht dafür, daß nicht nur die Fettverbrennung in der Leber gehemmt, sondern auch vermehrt Fett aus den Depots freigesetzt und in Umlauf gebracht wurde. Die in den Milzschnitten durch Berliner-Blau-Reaktion festgestellte deutliche Hämosiderose ist zwanglos auf die gleiche Noxe zu beziehen, die demnach eine Hämolyse verursacht hat. Als Ursache der Gewebsveränderungen läßt sich für alle Gruppen das Rinderserum bezeichnen.

Vergleicht man das Ausmaß der histologischen Veränderungen, so findet sich die Leberverfettung in den Gruppen II und III, also bei den mit dem Phosphatid behandelten Ratten, etwas geringer ausgeprägt als in Gruppe I. Dieser Unterschied ist jedoch nicht derart signifikant, daß man dem Leberphosphatid mit Bestimmtheit einen hemmenden Einfluß auf die toxische Wirkung des Fremdserums zusprechen könnte. Gegen eine solche Auffassung spricht vor allem die in sämtlichen Gruppen gleich stark ausgeprägte Hämosiderose der Milz.

Wir können also die Wirksamkeit des von Maekawa beschriebenen Prinzipes einer organspezifischen Antigenität von Gewebsphosphatiden wenigstens für die Rattenleber nicht bestätigen. Möglicherweise liegt das am Unterschied der verwendeten Tierspecies. Darüber hinaus muß man jedoch in diesem Zusammenhang grundsätzlich die Rolle der Leber als Schockorgan berücksichtigen. Histologisch ist die etwaige allergische bzw. anaphylaktische Genese von Leberparenchymschädigungen nicht zu

beweisen; das morphologische Bild ist primär durch Störungen des Gefäßapparates gekennzeichnet, woraus sich sekundär verschieden stark ausgeprägte Parenchymschädigungen mit entsprechender mesenchymaler Beteiligung entwickeln. Hierbei können die funktionellen und vor allem die morphologischen Folgen einer allergisch-hyperergischen Reaktion nicht von solchen unterschieden werden, die durch andere, unspezifische Faktoren bedingt sind.

Zusammenfassung

Auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen kann eine organ- und speciesspezifische Antigenität der Inositolphosphatidfraktion der Rattenleber nicht festgestellt werden. Der Fragenkomplex um die gezielte Organallergie der Leber wird an Hand eigener wie in der Literatur mitgeteilter Untersuchungsergebnisse besprochen.

Literatur

[1] Cavelti, Ph. A.: J. of Immun. **49**, 365 (1944). — [2] Emmrich, R., u. H. Petzold: Klin. Wschr. **1954**, 488. — [3] Folch, J.: J. of Biol. Chem. **146**, 35 (1942). — [4] Gemählich, M.: Z. wiss. Mikrosk. (Im Druck.) — [5] Joanovicz, G.: Münch. med. Wschr. **1909**, 466. — [6] Kämmerer, H.: Allergische Krankheiten. In Hdb. d. inn. Med. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — [7] Knepper, R.: Virchows Arch. **296**, 364 (1935). — [8] Letterer, E.: Die allergisch-hyperergische Entzündung. In Hdb. d. allg. Path. von Büchner-Letterer-Roulet, Bd. 7. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956. — [9] Maekawa, M.: I. Internat. Allergiekongr. Zürich 1951, Kongr.-Ber. 13—21. — [10] Int. Arch. Allergy **6**, 384 (1955). — [11] Acta Scholae Med. Kioto **32**, 195 (1955). — [12] Meyer-Kramer, H. G.: Z. exper. Med. **116**, 390 (1950). — [13] Oettel, H.: Z. klin. Med. **141**, 443 (1942). — [14] Scheiffarth, F., u. G. Berg: Allergie **3**, 25 (1954). — [15] Terai, H.: Fol. psychiatr. et neur. jap. **8**, 4 (1955). — [16] Vaubel, E.: Beitr. path. Anat. **89**, 374 (1932).

Professor Dr. med. F. Scheiffarth, Dr. med. M. Gemählich BS, F. Eberlein,
Medizinische Universitätsklinik, Erlangen, Krankenhausstraße 12

Druck von J. P. Peter, Gebr. Holstein, Rothenburg o. d. Tbr.

L e b e n s l a u f

Am 14. März 1930 wurde ich, Alfred, Leonhard Friedrich Eberlein, als zweites Kind des Studienprofessors Dr. David Eberlein und seiner Ehefrau Margarete geb. Schwemmer zu Nürnberg geboren. Nach der Elementarschulzeit von 1936 - 1940 trat ich in das Melanchthon-Gymnasium Nürnberg ein, das ich bis zur Erlangung des Reifezeugnisses im Juli 1950 besuchte. Bis 1952 arbeitete ich als Volontär in verschiedenen technischen Betrieben; mit dem Winter-Semester 1952/53 begann ich das Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen. An der gleichen Universität verbrachte ich nach bestandener ärztlicher Vorprüfung die klinischen Semester des Studiums und legte hier auch im Sommer-Semester 1958 die ärztliche Prüfung ab.

Am 14. März 1930 wurde ich, Alfred, Leon-
hard Friedrich Thürlein, als zweites Kind des Stu-
dienprofessors Dr. Levin Eberlein und seiner Ehefrau
Margarete geb. Schwemmer zu Nürnberg geboren. Nach
der Elementarschulzeit von 1936 - 1940 trat ich in
das Melanchthon-Gymnasium Nürnberg ein, das ich bis
zur Erlangung des Reifezeugnisses im Juli 1950 be-
suchte. Bis 1952 arbeitete ich als Volontär in ver-
schiedenen technischen Betrieben; mit dem Winter-
semester 1952/53 begann ich das Studium der Medizin
an der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen.
In der gleichen Universität verbrachte ich nach be-
standener ärztlicher Vorprüfung die klinischen Se-
mester des Studiums und legte hier auch im Sommer-
semester 1958 die ärztliche Prüfung ab.